



TITLE:

レンチウイルスを用いたB型肝炎cccDNA阻害剤の探索(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

竹内, 文彦

CITATION:

竹内, 文彦. レンチウイルスを用いたB型肝炎cccDNA阻害剤の探索. 京都大学, 2019, 博士(生命科学)

ISSUE DATE:

2019-05-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k21976>

RIGHT:

(続紙 1)

京都大学	博士（生命科学）	氏名	竹内 文彦
論文題目	レンチウイルスを用いたB型肝炎cccDNA阻害剤の探索		
<p>（論文内容の要旨）</p> <p>現在、B型肝炎ウイルス（HBV）の慢性感染者をウイルス完全排除へと治療する方法は存在しない。これは HBV の増殖の根源となる核内 HBV DNA (Covalently Closed Circular DNA: cccDNA)を除去する方法が発見されていない為である。cccDNA は少量しか存在しないことから簡易にそのモニターをすることはできず、薬剤評価のためのスクリーニングに適応するのは難しかった。そこで、本論文では環状 DNA を容易に評価することを目的として新たな実験系を構築した。インテグラーゼを欠失するレンチウイルスは感染後、逆転写された遺伝子の多くを環状 DNA として核内に保持することを確認した。このレンチウイルスの環状 DNA にルシフェラーゼ遺伝子を導入し、レンチウイルスの環状 DNA を簡便なルシフェラーゼアッセイで検出可能にした。この実験系を用いて 3840 種の薬剤を評価した所、12 種の薬剤がルシフェラーゼ活性を優位に下げる事を見出した。そのうち細胞毒性を示さず、ルシフェラーゼ活性を 50%以下に阻害し、レンチウイルス環状 DNA コピー数を減少させる薬剤として、血液凝固阻害活性を持つことが知られていたジクマロールを同定した。</p> <p>HBV の感染受容体であるヒトナトリウムタウロコール酸共役輸送体を発現するヒト肝臓癌由来細胞株細胞とヒト初代継代細胞を用いた HBV 感染実験で、ジクマロールが細胞内 HBV RNA、HBV DNA、培養上清中の HBV 抗原、HBV DNA を減少させることを見出した。これらの結果より、ジクマロールは HBV の複製阻害活性を有することが示された。また、HBV 安定発現細胞株と HBV 感染細胞を用いた実験で、ジクマロールが実際に HBV cccDNA のコピー数を減少させることを見出した。またジクマロール同様に血液凝固阻害活性が知られているジクマロールの複数の誘導体は抗 HBV 活性を示さなかった。この事より、血液凝固阻害活性と HBV 増殖阻害は別の生理活性であると考えられた。</p> <p>以上の結果より、インテグラーゼ欠失レンチウイルスを用いた系は、核内環状 DNA の安定性を評価できる実験系であることが明らかとなった。また、この実験系で阻害活性が見出されたジクマロールは HBV の増殖阻害、特に cccDNA の減少を引き起こすことが明らかとなった。この実験系を応用した薬剤スクリーニング系は新規抗 HBV 薬の探索に有効であり、HBV 慢性感染の原因となっている cccDNA を標的とした新たな創薬戦略として有効であると考えられた。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

B型肝炎ウイルスの慢性感染者は肝炎、肝硬変、肝臓という経過をたどることが知られているが、現在の治療法ではウイルス排除による完治が困難である。また、ウイルスの培養法が限られており、ヒト以外の動物での感染モデルは非常に限定されている。このため抗HBV薬剤のスクリーニングを効率的に行う系が待望されている。申請者はHBVの増殖の根幹であるcccDNAが肝細胞の核内にエピソームとして存在することに注目し、新たな薬剤スクリーニング系を確立することを目指した。

レンチウイルスは宿主細胞に侵入後RNAゲノムを直鎖型二重鎖DNAに転換して宿主ゲノムに組み込み、プロウイルスとして増殖を開始する。申請者はインテグラーゼを欠損するレンチウイルスベクターに注目して、これを基礎としたスクリーニング系を立ち上げた。まず作製したレンチウイルスベクターはゲノムに組み込まれることなく、その多くが環状エピソームとして存在することを示した。さらにベクターに組み込まれたルシフェラーゼレポーター遺伝子の発現によって環状エピソームをモニターすることが可能であることを示した。

この系を用いて化合物約4000種類を調べ、ルシフェラーゼ活性を抑制する薬剤12種類を得た。阻害活性の高かった化合物、ジクマロールに注目してその後の解析を行った。次にHBVの増殖に与える影響を、感染受容体を強制発現したHepG2細胞、初代肝細胞を用いて検討したところ、ジクマロールはHBVの増殖を抑制することを見出した。さらにHBV cccDNAを誘導的に発現する培養細胞を用いて解析した結果、ジクマロールはcccDNAを減少させることを発見した。また、ジクマロールは血液凝固阻害活性を持つことが知られているが、同活性を有するジクマロール誘導体は抗HBV活性を持たないことから、血液凝固阻害とは別の薬理作用であると考えられた。しかし、どのような機構でHBV増殖が阻害されるのかについては今後の課題である。

以上のように、本論文は新たなベクターを用いたエピソームのスクリーニング系を確立し、このスクリーニングによってHBV増殖阻害活性を有する化合物が得られることを実証した。本論文では生命科学の理解・発展に寄与する新しい発見が示されており、論理的かつ一貫性を持って記述されている。よって、本論文は博士(生命科学)の学位論文としての評価基準を満たすものと判断した。さらに、平成31年3月14日に行われた論文公聴会とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。

論文内容の要旨及び審査の結果の要旨は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。特許申請、雑誌掲載等の関係により、学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。(ただし、学位規則第8条の規定により、猶予期間は学位授与日から3ヶ月以内を記入すること。)

要旨公開可能日： 年 月 日